石斛藥材活性成分之研究

陳建志
國立中國醫藥研究所

摘 要

中藥材石斛早在《神農本草經》中就有記載，並列爲上品，具生津益胃、滋陰潤肺及解熱止渴。近代藥理學研究得知，石斛具抗衰老作用，同時亦可提高胃液的分泌及血清胃泌素的濃度。商品石斛來源於蘭科石斛屬（*Dendrobium*）、金石斛屬（*Ephemerantha*）和石仙桃屬（*Pholidota*）等多種植物之乾燥莖。據大陸學者調查，在大陸的中藥市場，約有三十幾個來源不同的品種當作石斛藥材使用。據本人調查，目前台灣中醫藥界所用之石斛藥材，除了石斛屬植物外，還大量使用大爪石斛（*Ephemerantha lonchophylla*）。

由於在本省中藥市場中，黃草石斛（*Dendrobium loddigesii*）及大爪石斛被使用的頻率很高，因此本報告將針對這兩種藥材，探討其抗血小板凝集活性及抗氧化活性，並從中分離出個別的活性成分，以期對石斛之開發及利用有所幫助。

前　言

中藥材石斛早在《神農本草經》中就有記載，並列爲上品，具生津益胃、滋陰潤肺及解熱止渴。近代藥理學研究得知，石斛具有下列諸作用：

1. 抗衰老作用（表一、表二）—施紅等[1]以家兔爲實驗動物，每天給予石斛煎劑六週。結果顯示石斛能顯著提高 SOD 的量，降低 LPO 的含量，同時可以使 MAO 的活性下降，故石斛有抗衰老作用。
2. 可提高胃液的分泌及血清胃泌素的濃度（表三、表四）—陳少夫等[2]選擇慢性淺表性胃炎患者，經胃管注入石斛煎劑或蒸餾水後，觀察胃排酸量及血清胃泌素之變化。結果顯示：注入石斛煎劑後胃酸及血清胃泌素的濃度明顯升高，如此爲治療萎縮性胃炎提供了初步依據。
3. 抗腫瘤活性作用（表五、表六）—馬國祥等[3]自鼓槌石斛（*Dendrobium chrysotoxun*）分離出 erianin 、 confusarin 及 chrysotoxene 三個化合物，經抗腫瘤試驗，發現各樣品均具不同程度的抗腫瘤活性，對小鼠肝癌（HePA）以 erianin 作用最強，其抑制率爲 50.82% ；對艾氏腹水癌（ESC）以 chrysotoxene 作用最強，其抑制率爲 62.25% 。
4. 延緩大白鼠半乳糖性白內障的發展，且有一定的治療作用[4]（表七、表八）

商品石斛來源於蘭科（Orchadceae）石斛屬（*Dendrobium*）、金石斛屬（*Ephemerantha*）和石仙桃屬（*Pholidota*）等多種植物之乾燥莖。據大陸學者調查，在大陸的中藥市場，約有 30 個來源不同的品種混爲石斛藥材使用（表九）。[5-7] 據本人調查，目前台灣中醫藥界所用之石斛藥材，除了 *Dendrobium* 屬植物外，還大量使用大爪石斛（有瓜石斛，戟葉金石斛，*Ephemerantha lonchophylla*）當做石斛藥材。

抗血小板凝集活性研究

本人曾自黃草石斛（*Dendrobium loddigesii*）分離出 moscatilin 及 moscatin 具抗血小板凝集活性，對 arachidonic acid(AA) 所引起的兔子血小板凝集，其 IC_{50} 分別爲 10（g/mL 及 7.5 g/mL)[8]。 1991 年 Tezxuka 等人曾發表大爪石斛的化學成份分析，得到一些酚類化合物，但沒有藥理活性的檢測[9]。今我們研究發現，大爪石斛乙醇抽出物對 AA 所引起的兔子血小板凝集之 IC_{50} 爲 0.02mg/mL ，因此我們利用生物活性追蹤法找尋具抗血小板凝集活性之化合物。

材料與方法

(一)材料

大爪石斛(*Ephemerantha lonchophylla*)藥材是購自台北市迪化街德和中藥房，並經南京中國藥科大學王峥濤教授的藥材鑑定。

(二)活性成分分離：

市售品石斛 (3kg) ，經粉碎後，加入適量之乙醇，於 60 ℃水浴上抽取，反覆抽取三次，經過濾、合併、減壓濃縮得乙醇抽出物。

乙醇抽出物以矽膠管柱層析分離，依序以正己烷—乙酸乙酯、乙酸乙酯—甲醇，當沖提劑，經不同溶媒梯度分爲十個 Fractions(Fr.1 至 Fr.10)。其中 Fr.6 以 silica gel(二氯甲烷：乙酸乙酯= 20 ： 1) 管柱層析分離，共分爲六個 Fractions (Fr.6-1 至 Fr.6-6) ， Fr.6-1 以再結晶方式 (正已烷—丙酮) 得到化合物 1 (462.7 mg) 。 Fr.6 -4 以 Sephadex LH-20(甲醇) 及 silica gel(氯仿：甲醇= 20： 1) 管柱層析分離得到化合物 2(26.5 mg) 。

Fr.7以 silica gel(二氯甲烷烷：乙酸乙酯= 20:1) 管柱層析分離，共分爲八個 Fractions (Fr.7-1 至 Fr.7-8)。 Fr.7-4 與 Fr.7-5 混合，以 Sephadex LH-20(甲醇) 、 silica gel(二氯甲烷) 管柱層析分離，得到化合物 3(19.3mg) 及 4(27.1 mg) 。7r.7-8 以 Sephadex LH-20(甲醇) 管柱層析分離得到化合物 5(4.2mg) 。

Fr.8以 Sephadex LH-20(甲醇) 管柱層析分離，共得到八個 Fractions(Fr.8-1 至 Fr.8-8) 。 Fr.8-2 以 Sephadex LH-20(甲醇) 、 silica gel(氯仿：甲醇= 10:1) 及 silica gel (氯仿：丙酮= 5:1) 管柱層析分離得到化合物 6(84.6mg) 。

(三)抗血小板凝集活性檢測

此部分是委託臺大藥理研究所鄧哲明教授進行。在 in vitro 下，針對 thrombine, arachidonic acid , collagen, platelet activating factor 所引起血小板凝集的活性抑制試驗。

1. 富含血小板血漿的製備 (platelet-rich plasma, PRP)

以 3.8% 的 sodium citrate 爲抗凝血劑，與全血以 1:14(v/v) 之比例混合，在室溫下立刻以 90 (g 離心 10 分鐘，所得上層即爲富含血小板血漿。

2. 兔子血小板懸浮液的製備 (platelet suspension, PS)

根據 Teng et al 的方法， 9 用 100 mM EDTA 與兔子 (New Zealand White) 耳靜脈抽出血以 (1:14) 的比例混合在室溫下立即以 90(g 離心 10 分鐘，取出上層富含血小板血漿後，再於 500(g 離心 10 分鐘。除去血漿後，將下層血小板以含有 EDTA(2mM) 及 bonine serumalbumin (BSA， 3.5mg/mL) 的 Tyrode 溶液懸浮之，並於相同轉速下離心後，再以不含 EDTA 的 Tyrode 溶液使其懸浮，並以 Coulter Counter(Model ZM) 計算血小板數目，調整其計數爲 4.5(10 8 platelets/

mL ，最後加入 1 mM Ca^{2+} ，靜置 30 分鐘，進行實驗。 Tyrode 溶液除了含有BAS外，其它組成如下(mM): NaCl(136.9), KCl(2.7), MgCl2(2.1), NaH2PO4(0.4), NaHCO3(11.9), glucose(11.1) 。

*3.*血小板凝集反應的測定

血小板凝集反應乃是根據 O'Brien(1962) 之濁度測定法，以 Lumi-aggregometer(Chrono-Log Co. U.S.A) 測之。將製備好的血小板加入經 Silicone 包衣的小玻璃管中，並以磁棒做每分鐘 1200 轉的攪拌。若未特別說明，均在加入凝集引發劑前 3 分鐘添加抑制劑，全部過程皆在 37 ℃下進行。凝集程度的計算，係以 PRP 或 PS 的吸光度做為 0% 的血小板凝集，以不含血小板的血漿 (platelet-poor plasma, PPP) 或 Tyrode 溶液的吸光度做為 100% 的血小板凝集，使用下列公式計算：

$$\text{凝集}(\%) = \frac{\text{加凝集引發劑前的吸光度} - \text{加凝集引發劑後的吸光度}}{\text{加凝集引發劑前的吸光度} - \text{Tyrode 溶液（PPP）的吸光度}} \text{ X } 100\%$$

結果與討論

市售品石斛藥材經粉碎後，加入適量之乙醇，於 60 ℃水浴上抽取，反覆抽取三次，經過濾、合併、減壓濃縮得乙醇抽出物。乙醇抽出物以色層層析分離，共得到六種 stilbene 類化合物，其中包括二種新化合物 ephemeranthol-H(5) 及 ephemeranthone(6) ，及四種已知化合物 denbinobin (1)9 、3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene(2)10 、 3-methylgigantol (3)9 及 erienthridin(4)9(Fig.1) 。這四種已知化合物是經由光譜的分析及與文獻對照而確認。

分離出之六種化合物，除了 ephemeranthol-H (5) 因量太少無法檢測抗血小板凝集活性，其餘均用兔子的血小板測試抗血小板凝集活性。化合物 ephemeranthone(6) 對因 AA 所引起的血小板凝集之抑制活性較差，其 IC_{50} 約 60(M 。化合物 1 、 2 、 3 及 4 的抗血小板凝集活性則列於 Table 10 ，四種化合物對因 AA 所引起的血小板凝集均有較強的抑制活性，其抑制活性排列為化合物 4>2>3>1 ，化合物 4 、 2 及 3 的 IC_{50} 值分別約為 9 μM 、 24 μM 及 30 μM 。

結　論

由大陸學者研究發現，石斛藥材有抗衰老作用、增強胃液分泌作用、抗腫瘤作用及延緩大白鼠半乳糖性白內障的發展與治療作用。同時由本研究中亦證實石斛藥材具抗血小板凝集活性，由此推測石斛藥材可能亦有抗氧化活性。此些藥理活性的

發現，亦證實石斛藥材在中醫臨床上之療效。但市場上石斛藥材的混亂情形，可能會直接或間接影響石斛藥材的療效。爲求品質的穩定，在本省種植石斛藥材是有其必要性，如此對石斛之開發及利用定有所幫助。

誌　謝

本研究承衛生署中醫藥委員會之經費支持 (CCMP86-RD-028)、臺灣大學醫學院藥理學科鄧哲明教授協助測試抗血小板凝集、及南京中國藥科大學王峥濤教授的藥材鑑定，謹申謝忱。

參考文獻

1. 施紅，黃玲：石斛抗衰老作用的實驗研究。中華老年醫學雜誌 1994;13 ： 104.
2. 陳少夫，李宇權，吳亞麗，周卓，孫麗華：石斛對胃酸分泌及血清胃泌素、血漿生長抑素濃度的影響。中國中藥雜誌 1995; 20 ： 181-182.
3. 馬國祥，徐國鈞，徐珞珊，王俏先：鼓槌石斛及其化學成分的抗腫瘤活性作用。中國藥科大學學報 1994; 25 ： 188-189.
4. 楊濤，梁康，張昌穎：四種中草藥對大鼠半乳糖性白內障防治效用的研究。北京醫科大學學報 1991; 23 ： 97-99.
5. 鄭博仁：雲南石斛屬藥材現狀及其原植物。中國中藥雜誌 1990;15 ： 9-11.
6. 李滿飛，徐國鈞，徐珞珊，金蓉鸞：商品石斛的調查及鑑定 (II)。中草藥 1991; 22 ： 173-176.
7. 馬國祥，徐國鈞，徐珞珊，李滿飛：商品石斛的調查及鑑定 (III) 。中草藥 1995;26 ： 370-372.
8. Chen C C, Wu LG,Ko FN, Teng CM：Antiplatelet aggregation principles of Dendrobium loddigesii. J Nat Prod 1994;57：1271-1274.
9. Tezuka Y, Hirano H,Kikuchi T, Xu GJ: Constituents of Ephemerantha lonchophylla; Isolation and structure elucidation of new phenolic compounds, ephemeranthol-A, ephemeranthol-B, and ephemeranthoquinone, and of a new diterpene glucoside, ephemeranthoside. Chem Pharm Bull 1991; 39 : 593-598.
10. Leong YW,Kang CC, Harrison LJ, Powell AD: Phenanthrenes, dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the Orchid Bulbophyllum vaginatum. Phytochemistry 1997; 44, 157-165.

表一：石斛對 SOD 及 EPO 的影響

時間（週）	SOD (U/g, Hb)		LPO (nmol/mL)	
	對照組	治療組	對照組	治療組
0	125.7	126.7	6.2	0.3
2	113.6	212.5	7.2	5.7
4	106.4	292.9	11.0	4.8
6	102.6	343.7	11.3	3.7

SOD: 超氧化物岐化酵素　LPO: 過氧化脂質

表二：石斛對 MAO 及 HYP 的影響

時間（週）	MAO (nmol/mL)		HYP (μg/mL)	
	對照組	治療組	對照組	治療組
0	250.3	247.5	0.38	0.33
2	251.9	248.5	0.34	0.38
4	238.6	197.3	0.33	0.41
6	226.2	174.4	0.23	0.46

MAO: 單氨氧化酵素　HYP: 氫脯氨酸

MAO 與腦內單氨對神經的調節有關，MAO 活性增加會促進衰老。

表三：石斛對血清胃泌素濃度的影響　ng/L

分組	空腹	藥後	
		30 分鐘	90 分鐘
對照組	154.9	155.2	143.3
實驗組	142.0	238.5	196.8

表四：石斛對胃酸分泌的影響　mmol/hr

分組	藥前 1 小時	藥後	
		1 小時	2 小時
對照組	3.07	2.69	3.21
實驗組	3.49	9.65	10.06

Table 5: Inhibitory effects of the components from *Dendrobium chrysotoxum* on HePA in mice, $n = 10$

Group	Dosage mg/kg	Increasing ratio of mouse wt. %	Wt. of tumor (g)	Inhibition, %
control	0.5 mL/20g	31.60	2.44 ± 0.71	
erianin	10	12.71	1.20 ± 0.42	50.82***
confusarin	10	21.06	1.38 ± 0.48	43.44***
chrysotoxene	10	17.86	1.73 ± 0.95	29.10
D. chrysotoxum EtOH ext.	100	24.00	1.42 ± 0.62	41.80***
5FU	10	22.81	0.89 ± 0.39	65.52***

***p<0.01 compared with control group

Table 6: Inhibitory effects of the components from *Dendrobium chrysotoxum* on ESC in mice, $n = 10$

Group	Dosage mg/kg	Increasing ratio of mouse wt. %	Wt. of tumor (g)	Inhibition, %
control	0.5 mL/20g	88.36	2.04 ± 0.71	
erianin	10	60.31	0.98 ± 0.27	51.96***
confusarin	10	63.56	0.86 ± 0.37	57.84***
chrysotoxene	10	36.11	0.77 ± 0.22	62.25***
D. chrysotoxum EtOH ext.	100	57.09	0.80 ± 0.34	60.78***
5FU	10	26.71	0.71 ± 0.26	65.20***

***p<0.01 compared with control group

表七：石斛對大鼠半乳糖性白內障晶狀體混濁度的影響 (%)

組別	混濁度	注射半乳糖的天數						
		4	7	10	15	20	25	30
正常對照組 (28)	—	100	100	100	100	100	100	100
半乳糖組	+	88.9	100	34.0	6.2	2.8	2.8	
(白內障)	++			54.2	31.4	17.1	8.6	2.8
(35)	*			11.8	57.2	48.6	40.0	5.7
	**				6.2	31.5	48.6	91.5
石斛 + 半乳糖組	—	73.6	47.3	26.3	26.3	26.3	31.6	36.8
(19)	+	26.4	52.7	73.7	73.7	73.7	58.4	42.1
	++						5.2	15.8
	*						4.8	5.3

無混濁，+ 輕度混濁，++ 高度混濁，* 核混濁，
括號中的數字爲動物隻數。

表八：在連續注射半乳糖 15 天後給予石斛水煎劑對大鼠晶狀體混濁度的影響 (%)

組別	混濁度	停止注射半乳糖的天數				
		1	4	7	10	15
對照組	—					10.0
	+	100	33.0	17.0	17.0	17.0
	++		67.0	66.0	50.0	40.0
	*			17.0	33.0	33.0
石斛組	—		17.0	25.0	58.3	100
	+	100	83.0	75.0	41.7	

- 無混濁，+ 輕度混濁，++ 高度混濁，* 核混濁，每組大鼠 12 隻。

表九：西雙版納石斛類藥源調查及商品鑑定

商品名稱	原植物
西鳳斗	鐵皮石斛 *D. officinale*
	細莖石斛 *D. moniliforme*
細黃草	細莖石斛 *D. moniliforme*
	齒瓣石斛 *D. devonianum*
	鉤狀石斛 *D. aduncum*
粗黃草	密花石斛 *D. densiflorum*
	報春石斛 *D. primulinum*
	流蘇石斛 *D. fimbriatum*
扁黃草	金釵石斛 *D. nobile*
	大苞鞘石斛 *D. wardianum*
	距唇石斛 *D. linawianum*
小瓜黃草	短棒石斛 *D. capillipes*
	鼓槌石斛 *D. chrysotoxum*
有瓜石斛	戟葉金石石斛 *Ephemerantha lonophylla*
	雲南石仙桃 *Pholidota yunnanensis*

Table 10. Effect of Purified Components from *Ephemerantha lonchophylla* on the Platelet Aggregation Induced by Thrombin (Thr), Arachidonic Acid (AA), Collagen (Col), and Platelet-Activating Factor (PAF).[a]

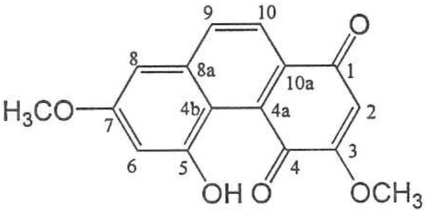
Compound	Concentration (μg/mL)	% Aggregation			
		Thr	AA	Col	PAF
Control		92.6 ± 1.4 (3)	85.9 ± 0.5 (5)	88.1 ± 0.9 (4)	88.1 ± 0.7 (4)
Denbinobin (**1**)	100	87.6 ± 1.2 (3)[d]	71.6 ± 7.2 (3)[c]	80.9 ± 2.6 (3)[b]	91.1 ± 1.5 (4)
Erienthridin (**4**)	100	86.3 ± 0.4 (3)[d]	0.0 ± 0.0 (5)[d]	16.3 ± 1.8 (3)[d]	34.2 ± 5.1 (4)[d]
	10		0.0 ± 0.0 (5)[d]		
	5		10.9 ± 4.3 (5)[d]		
	2		54.1 ±14.0(5)[b]		
	1		80.1 ± 3.6 (5)		
3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene (**2**)	100	90.2 ± 1.5 (3)	0.0 ± 0.0 (5)[d]	11.8 ± 1.7 (3)[d]	7.0 ± 2.8 (4)[d]
	50		0.0 ± 0.0 (5)[d]		75.4 ± 3.7 (3)[c]
	20		0.0 ± 0.0 (5)[d]		84.3 ± 2.1 (3)
	10		12.1 ± 6.7 (5)[d]		
	5		57.7 ± 9.8 (5)[c]		
	2		75.7 ± 4.8 (5)		
3-methylgigantol (**3**)	100	89.2 ± 1.1 (3)	0.0 ± 0.0 (5)[d]	4.2 ± 2.0 (3)[d]	1.4 ± 1.2 (3)[d]
	50		0.0 ± 0.0 (5)[d]		62.1 ± 4.2 (3)[d]
	20		10.7 ± 5.4 (5)[d]		80.6 ± 3.6 (3)[b]
	10		35.1 ± 14.8(5)[c]		
	5		69.1 ± 7.6 (5)[b]		

[a]Platelets were preincubated with each fraction or the solvent (0.5% DMSO, control) at 37°C for 3 min, then thrombin (0.1 U/mL), AA(100 μM), collagen (10 μg/mL) or PAF (2 ng/mL) was added. Percentages of aggregation are presented as means ± S.E. and statistical significance was evaluated by Student's *t* test.

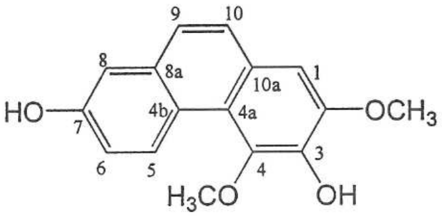
[b]$P<0.05$ as compared with control values.

[c]$P<0.01$ as compared with control values.

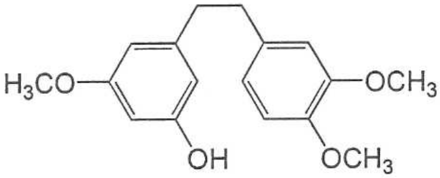
[d]$P<0.001$ as compared with control values.



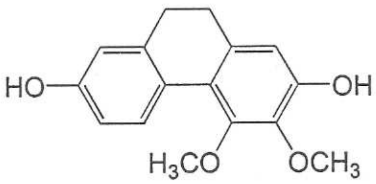
1



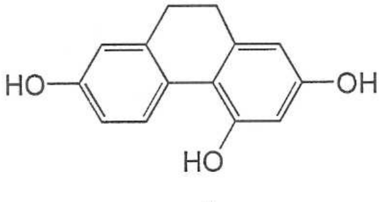
2



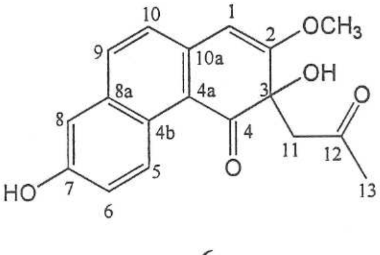
3



4



5



6

Fig. 1: Chemical structures of compounds isolated from *Ephemerantha lonchophylla*.

Studies on the Bioactive Principles of *Dendrobii caulis*

Chien-Chih Chen
National Research Institute of Chinese Medicine

Abstract

The Chinese herb drug *Dendrobii caulis* was recorded long time ago as an upper-grade herb in Shennung's Herbal, where the herb was described as possessing the effects of promoting salivation, benefiting the stomach, nourishing yin, miostening the lung, resolving heat and quenching thirst. Current pharmacological studies also have shown that *Dendrobii caulis* has antisenescence effect and can promote the secretion of gastric juice and increase serum gastrin concentration. Commercial articles of this herb are available as the dried stems of many plants belonging to the genera Dendrobium, Ephemerantha and Pholidota. According to the investigation made in mainland China, there are some thirty species of plants used as the sources of this drug in mainland China's herb markets. My investigation has found that the drug materials used as *Dendrobii caulis* in Taiwan area come massively from Ephemerantha lonchophylla in addition to those from the *Dendrobium* genus.

As *Dendrobium loddigesii* and *Ephemerantha lonchophylla* have been used for this drug in a very high percentage and frequency in Taiwan's herb market, this report will be focused on the study of these two plants for their antiplatelet aggregation and antioxidative activities, and also on the isolation of active principles from these two plants, which we hope to contribute to the development and utilization of the herb.